

⑩ 日本国特許庁 (J P)

⑪ 特許出願公表

⑫ 公表特許公報 (A)

昭63-503242

⑬ 公表 昭和63年(1988)11月24日

⑭ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

予備審査請求 未請求

部門(区分) 6(1)

G 01 N 33/58

C 12 Q 1/68

G 04 D 1/70

G 09 F 3/03

A-8305-2G

A-6807-4B

6807-4B

6781-2F

D-6810-5C

(全 11 頁)

⑯ 発明の名称 真偽を立証したい物品の標識

⑰ 特 願 昭62-502252

⑱ 出 願 昭62(1987)4月9日

⑲ 翻訳文提出日 昭62(1987)12月9日

⑳ 国際出願 PCT/CB87/00242

㉑ 国際公開番号 WO87/06383

㉒ 国際公開日 昭62(1987)10月22日

優先権主張 ㉓ 1986年4月9日 ㉔ イギリス(GB) ㉕ 8608629

⑰ 発 明 者 リ・ページ, リチャード・ウィ イギリス国、ケンブリッジ・シー・ビー・2・1・ティ・エイ、ゴ
リアム・フアラ ンビル・アンド・カイウス・カレッジ(香地なし)

⑱ 発 明 者 スレイター, ジェイムズ・ハワ イギリス国、カーディフ・シー・エフ・4・5・エス・アール、リ
ード ズベイン、ホウル・ワイ・ディリン・38

㉒ 出 願 人 バイオタル・リミテッド イギリス国、カーディフ・シー・エフ・4・5・ディー・エル、チ
ルターン・クロウズ・5

㉓ 代 理 人 弁理士 川口 義雄 外2名

㉔ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特許), G
B, GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), NO, SE(広域特許), US

発 明 の 説 明

1. 真偽を立証したい品物または物質の標識方法であって、所定の巨大分子の第一化合物(シグナル化合物)を用いてこの第一化合物の正体を明らかにすることなく品物または物質を標識し、この第一の化合物には相補的な第二の化合物が結合し得、その結果第一の化合物の存在を明らかにし、したがって品物または物質が本物であることを立証できるようなっていることを特徴とする方法。

2. シグナル化合物を直接品物もしくは物質中に組み込むか、シグナル化合物を品物もしくは物質に付着せしめるか、シグナル化合物を含んでいる材料を品物もしくは物質に施布適用するか、またはシグナル化合物を品物もしくは物質の内容物中に含ませることによって、標識を達成する、請求の範囲1に記載の方法。

3. シグナル化合物が付着しているタグを用いて物品を標識する、請求の範囲1に記載の方法。

4. タグを、直接物品に取り付けるか、物品の製造の一部として物品中に直接組み込むか、またはその他のやり方で物品に結合する、請求の範囲3に記載の方法。

5. 巨大分子の形態にあるシグナル化合物を用いて品物または物質を標識する、請求の範囲1に記載の方法。

6. 細菌もしくはカビ類の胞子の形態またはウイルスの形態にあるシグナル化合物を用いて品物または物質を標識する、請求の範囲1に記載の方法。

7. シグナル化合物が核酸である、請求の範囲1に記載の方法。

8. 核酸がDNAである、請求の範囲7に記載の方法。

9. DNAが、特異的DNAプローブとハイブリダイズし得る1個以上のシグナル配列を含んでいる、請求の範囲8に記載の方法。

10. 前記DNAを他のDNAと混合する、請求の範囲8に記載の方法。

11. DNAが、微生物のゲノムDNAまたは制限エンドヌクレアーゼによるその部分断片化に由来するDNAである、請求の範囲8に記載の方法。

12. DNAがプラスミドの形態にある、請求の範囲8に記載の方法。

13. DNAが合成DNAである、請求の範囲8に記載の方法。

14. 各々が別々の領域を占めている一連の異なるシグナル化

化合物を準備する、請求の範囲1に記載の方法。

15. 一連の別々の領域の同一のシグナル化合物を準備する、請求の範囲1に記載の方法。

16. 資料品、医薬およびその他の化学薬品、フィルムおよびレコード、銀行券、美術工芸品、証券類ならびに機会および部品から選択された品物または物質を鑑識する、請求の範囲1に記載の方法。

17. その品物または物質がシグナル化合物で鑑識されているかどうかを、第一の化合物の存在を明らかにできるように相補的な第二の化合物を用いて決定し、その結果品物または物質が本物であることを確かめることをさらに含んでいる、請求の範囲1に記載の方法。

18. 品物または物質の真偽を決定するための方法であって、

(I) 品物または物質が所定の巨大分子の第一化合物（「シグナル化合物」）によって鑑識されているかどうかを、第一の化合物の存在を明らかにできるようにこの第一の化合物に結合することができる相補的な第二の化合物を用いて決定し、その結果、

(II) 品物または物質が本物であることを決定することを特徴とする方法。

明 細 書

真偽を立証したい物品の鑑識

本発明は物品の真偽を立証する (to authenticate) ための物品の鑑識 (ラベル付け) に係る。

現代の世界は多くの領域で真偽の立証に関する重要な問題に直面している。製造業界でみられるような大量生産された模造品にしても芸術の世界でみられるような贋作にしても、これらは混乱を引起し、かつ真の製作者にとっては収益の損失を招く。産業の発達した国々の内での世界貿易に関しては真偽鑑識の行為によって何兆ものドルが失われると推定されている。時計、電気製品、ハイファッションの衣服などのような一流で価値の高い物品の製造業者にとっては事は特に重大である。生産国または外国での模造品の販売は産業界にとって悪取引上の主要な紛争である。明らかに、値の高い低価格の製品もまた模倣と詐欺的販売の対象になる。

さらに、個人、法人、公共団体および政府が模倣の抑制以外の理由で本物の品物を鑑識したいと思うのには多くの理由がある。たとえば、ある物品または品物 (アイテム) の限定的な運

19. シグナル化合物の存在を検出する、請求の範囲18に記載の方法。

20. シグナル化合物に結合することができる鑑識された核酸プローブを、品物または物質が本物である場合にシグナル化合物が占めている領域に接触させ、このプローブがこの領域で第一の化合物とハイブリダイズするかどうかを判定する、請求の範囲18に記載の方法。

21. プローブがDNAプローブである、請求の範囲20に記載の方法。

22. 核酸の、品物または物質のラベルとしての用途。

命の確保を可能にするように製造・販売網 (ネットワーク) に結んだ本物の品物の流れを追跡記録 (モニター) するためである。これによってある特定の製造ネットワークの他と比べた効率に関する情報が得られるであろう。そしてこの場合明らかに模倣に対して対処する必要はほとんどない。しかしこの原理は、品物を一時的に、そして鑑識された品物の明白な同定を可能にするシステムによって鑑識する場合もやはり同じである。

それ自体模倣されることがなく、したがって製造された真の品物を保護するのに応用されることのない完全に安全な保護システムを得るためにいろいろな作動モードに適用することができるシステムに対するニーズがある。そのようなシステムを適当な操作条件下で用いると本物の物品の取引と販売をモニター・制御・調節することができ、しかも製造業者と消費者の双方をある程度保護することになる。次の3つの主要な保護機能を達成するように設計された完全に安全なシステムに対するニーズがある。

(a) ある品物のコピー (複製) 品を製造・販売する権利をもたないコピー業者による、コピーされた真の品物の詐欺的販売から真の製造業者を保護すること。

(b) コピーされた真の詐欺品の故意または偶発的な販売からそ

れに気付かない消費者を保護すること。

(c) 政府および金での適当な政府機関が、個別にしろ大量生産にしろ模倣された真物品の商取引を適宜追跡・調節・制御・取締り・かつ訴訟する際に役にたつこと。

このたび、物品の真偽を立証する問題に対する新しいアプローチが開発された。本発明においては2つの重要な事実を考慮する。まず第一に、簡単な化学分析手順によってDNAまたはタンパク質自体のような分子の、存在または不存在を検出する能力を利用する。このような手順は、DNA（または別の巨大分子）が存在するか否かを示すプラス/マイナス試験である。異なる起源、すなわち異なる生体由来するいろいろなDNA分子間に区別はない。しかし、このシステムの分解能は2番目の事実、すなわち核酸やタンパク質のような化合物の全配列または置換部分がついている、一時的に認識され、したがってある物品が本物であることを明らかにする能力を利用することによってかなり改善することができる。

したがって本発明は真偽を立証したい品物または物質を認識する方法を提供する。この方法は品物または物質を所定の巨大分子からなる第一の化合物によって認識することからなるがこの際この第一の化合物の同一性（種類）を標識（公表）するこ

とが可能になったのである。本発明はタグ（目印）による本物の物品の認可された標識に依存しうる。このタグは、たとえば、このタグ（したがってこのタグが付けられている品物または物質）の真偽がこのタグの制作者（生産者、デザイナー）によってのみ決定できるような量、形態およびタイプで1種類以上のシグナル化合物を担持している。

あらゆる物質または品物（物品）を認識することができる。本発明の技術は時計、香水および衣服のような貴族品、医薬品ならびにその他の肥料、除草剤および殺虫剤のような化学品、フィルムおよびレコード、旅行券、美術工芸品、パスポートのような証券類、さらに自動車部品のような機械・部品類などに適用しうる。

標識はさまざまな方法で実施することができる。たとえば品物または物質の製造中にその中へ直接シグナル化合物を入れてもよい。あるいは、塗着剤などによってシグナル化合物を付着させてもよい。この塗着剤がシグナル化合物からなっているもよい。またシグナル化合物は、品物または物質に塗布される塗料またはインクのような材料中に含ませてもよい。品物または物質の内部物がシグナル化合物を含んでいてもよい。

シグナル化合物が付いているタグを用いて物品を認識しても

とはしない。この第一の化合物には相補的な第二の化合物が結合することができ、その結果第一の化合物の存在を明らかにでき、したがって品物または物質が本物であることを立証できる。

本発明はまた、品物または物質の真偽を立証・確認するための方法も提供する。この方法は、

- i) 所定の巨大分子からなる第一の化合物の存在または不存在が具現化され得るように第一の化合物に結合することができる相補的な第二の化合物を用いて、品物または物質が前記第一の化合物によって認識されているか否かを決定し、それにより、
- ii) 品物または物質の本物であることを決定することからなる。

便宜上ここでは第一の化合物をシグナル化合物と称する。このシグナル化合物は、たとえば核酸の場合は塩基の、タンパク質の場合はアミノ酸の配列からなり得、この配列には相補的な第二の化合物が結合する。ここではこの配列をシグナル配列と称する。

したがって、今や、各々が本物として一時的にしかも所定の程度の信頼性をもって認識され得るように標識を保護が置かれる品物もしくは物質または品物群もしくは物質群を認識するこ

よい。このシグナル化合物は透明なプラスチックシートによって保護しておいてもよい。このタグは物品に直接付着していてもよいし、物品の構造の一部として取込まれていてもよい。あるいは、このタグをその他の方法で物品と結び付けてもよい。たとえば、物品が包装されている箱の中に置く入れておくとか、または物品に付属する書類の間に挟んでおいてもよい。ある種の物品では、たとえば紙などではシグナル化合物を直接貼付してもよい。

シグナル化合物は、このシグナル化合物の存在の検出を可能にするように相補的な第二の化合物が結合することができる化合物である。シグナル化合物は核酸やタンパク質のような巨大分子である。そのような巨大分子の形態のシグナル化合物、すなわち他の巨大分子を用いて品物または物質を認識してもよい。この巨大分子は合成品でもよいし、天然源から得られたものでもよい。したがってDNAの複合、ゲノムDNAまたはその制限エンドヌクレアーゼによる部分別化によって得られるDNAを使用することができる。

しかしながら別方法として、標識としての使用条件に耐え得る分子またはその他生体の耐久段階の形態にあるシグナル化合物を用いて品物または物質を認識してもよい。DNAおよび

(ある種のウィルスの場合の) RNAでは、シグナル化合物は生体のゲノム全体またはその一部でよい。したがって、特にウィルス、細菌およびカビのような微生物を標識として使用することができよう。これらは少量で、しかし測定可能な量で使用し得る。菌子の例は、*B. subtilis*、*B. cereus*もしくは*B. megaterium*のような*Bacillus*の種または*Penicillium*もしくは*Aspergillus*のようなカビの種の菌子である。これらの場合DNAやRNAは再単離することができる生存系の中に含有され、そのDNAかRNAを測定することになるであろう。菌子DNAたとえばサケ菌子DNA (Sigma B-1501) もシグナル化合物として使用できる。

各々が別々の領域を占める一連のいろいろなシグナル化合物を提供し得る。あるいは、別々の領域の一連の同じシグナル化合物を提供してもよい。この場合、いろいろな第二の補助的化合物を使用して各領域のシグナル化合物内のいろいろなシグナル配列と結合させることができる。これは特にシグナル化合物が核酸である場合に適用される。シグナル化合物は核酸、DNAまたはRNAが好ましい。

簡単にいえば標識の目的には単に巨大分子の存在または不存在を検出するだけで十分であろう。すなわち、ある種の目的に

達することによって異なる種のDNAおよび同じ種の異なる株のDNAを区別することが可能である。当該生体のゲノムDNAからランダムに得られたDNAの断片からなる特別に標識されたプローブを使用することができる。合成DNAプローブを使用してもよく、同様にH-13プローブ標識体のようなバクテリオファグプローブも使用し得る。また、プラスミドプローブを使用することができる。このプローブDNAは異なるDNA分子内に含有されているかもしれない場合DNA配列とハイブリダイズすることができる。

したがって本発明においては、品物または物質がシグナルDNAで標識され得る。このシグナルDNAは特定のプローブDNAとハイブリダイズすることができる配列を含んでいる。この配列がシグナル配列である。シグナルDNAとプローブDNAとの双方が密接にされている。標識されている品物または物質をプローブDNAを用いて分析した結果シグナルDNAのシグナル配列が覆われた場合、この品物または物質は本物である。そうでなければその品物または物質は本物ではない。このプローブDNAはもちろん、ハイブリダイゼーションが生じたかどうかを同定化するように、たとえば放射能もしくは酵素ラベルによって、ビオチニル化(biotinylation)によって、または光

は、標の分子としての、または生体系の一部としてのDNAの存在を決定すれば十分であろう。DNAの存在を検出するには、エチジウムブロミド、アクリンオレンジまたはビス-ベンズイミド(H33258, Hoechst dye 33258)のような非特異的にDNAに結合する化学薬品を使用することができる。エチジウムブロミドの結合この化合物は普通の可視光の波長では検出できない。したがって標識はDNAとエチジウムブロミドとを共に提供することによって達成し得る。これらの存在はその紫外線によって検出することができる。これによって簡単な標識方法が得られるが、高い程度の致毒性は得られず、したがって高い安全性も得られない。それはプラス/マイナス試験である。

各種、さらに種内の各株に対するDNAの致毒性と、特定のDNA分子を迅速、一面的かつ正確に区別することに関する技術的水準とが相俟って、有生物と無生物とのあらゆる起源であらゆる種類の物品を、標識された物品が同定し得るように標識することの基礎となる。これによって、簡単なプラス/マイナス試験よりも洗練された形の標識が可能になる。

生体の各株についてDNAまたはRNAの分子は独特である。同じ種の異なる株は塩基の配列における小さな変化によって異なっている。たとえば、標識したDNAプローブでDNAを検

ビオチニル化(photobiotinylation)によって標識されている。

シグナルDNAは1種以上の異なるシグナル配列を含んでいてもよい。すなわち、同一のタグに対して所与のDNAシグナル分子を別個に数回使用して個々の特定DNAプローブのいずれを使用したかに応じた独特のシグナルを得ることができる。シグナル配列が反復して存在しているのが好ましい。これによってプローブDNAに対するシグナル配列の感度が向上する。シグナルDNAは微生物のゲノムDNAであるのが好ましいが、簡単な系では、合成して得られるような短いDNA配列を使用することもできる。ウィルスまたは最近のゲノムDNAを使用してもよく、同様にゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼで部分消化したものも使用できる。プラスミドも使用できる。

シグナルDNAのシグナル配列は、これとハイブリダイズすることができるプローブの入手容易性によってあらかじめ定められた配列とすることができる。それはDNA分子に固有の配列でもよい。あるいはまた、DNA分子の中に特別に導入してもよいし、DNA分子と混合してもよい。シグナル配列のサイズはプローブDNAに対する検出可能な応答が引き出されるようなものとすべきである。取扱上の理由から1~10kbpのシグナル配列が適切である。

シグナルDNAで標識された品物または物質が本物であるという確信がさまざまな程度で得られる。信頼性の程度はシグナルDNAを2種以上用いることによって向上することができる。品物または物質は、別々の領域が各々異なるシグナルDNAによって標識されていてもよい。シグナルDNAは別のDNAと混合して適用してもよい。これをここでは選別DNAと称する。この選別DNAが存在すると、シグナルDNAの正確なシグナル配列を決定しようとしている人の仕事が複雑になる。

本発明は以下のようにして適用され得る。一連の異なる微生物を個別に増殖させる。各々の微生物に対してゲノムDNAを抽出し、標準的な分子生物学の技術を用い、特定の制限エンドヌクレアーゼで消化して生成したゲノムDNAの短い配列をランダムにクローニングすることによって一組のいろいろなプロープを製造する。これによって、当該DNAを得ることができる微生物種のDNAをハイブリダイゼーションによって認識するプロープが生成する。したがってプロープDNAは、順次的にシグナルDNAのみが所有しているはずのシグナル配列を定める。

一時的なプロープが異なる種のDNAとハイブリダイズすることはありそうもないが、これは異なる起源のDNAに対して

そのプロープをハイブリダイズさせようとして見れば容易にチェックすることができる。クロスハイブリダイズするプロープはすべて認識することができる。類似の手順を使用して、同じ種の異なる株から得たDNAに対するハイブリダイゼーションを調べることによって後に特異的なプロープを得ることができる。クロスハイブリダイズしないものは所与の種のある特定の株に対して特異的である。追加したプロープを標識し、その後の使用に備えて貯蔵する。

タグを作るには、紙、標識したセルロースもしくはセルロースアセテートのシート、またはHybond CもしくはHybond N (Amersham International plc) などのようなナイロンベースの膜などといった通常の支持材料上の決められた位置にシグナルDNAを配置すればよい。シグナルDNAは、微生物の細胞から分離してかまたは処理済み細胞懸濁液もしくはペーストの形態で適用できる。このDNAはドット（点）またはバンド（帯）のいずれかで適用することもできる。各々のドットまたはバンドは異なる微生物から得たDNAであるか、または異なるシグナルDNAを含有している。DNAは、プロープDNAとハイブリダイズすることができる形態で支持材料に結合する。すなわち、DNAは通常酸性しておくかまたは一本鎖にしておく。典

型的な場合、各々別個の領域に適用されるシグナルDNAの数は1000〜10000である。シグナルRNAをDNAの代わりに用いてもよい。細菌やカビの胞子を直接使用してもよく、同様にウイルス粒子も使用できる。

こうして作成したタグを、真偽を立証したい品物または物質に結合する。そのようなタグによって標識されたなんらかの品物または物質の真偽を決定するには、貯蔵しておいた標識したプロープDNAを用いてタグを処理・加工する。プロープDNAをタグに接触させ、各シグナルDNAのシグナル配列に結合させる。プリセットパターンに従ってハイブリダイゼーションを測定して、標識された品物または物質が本物であることを確認する。

このようにして品物または物質が本物であるという非常に高度の信頼が達成できる。たとえば、タグがそれぞれ3つのドットのDNA 6列からなり、各DNAが異なっており、このタグを作るのに少なくとも1000個の独特なシグナル配列を与えるDNAの異なる1000個の配列が使用できると仮定しよう。1000個の別々の異なるDNAのプールからランダムに抜き出した3つのドットのいずれかの所与の列を偽造者が独立に再生できる確率は、パターンを作るのに1000個のDNAを使用したことを偽

造者が知っている場合で 10^3 に1である。いかなる偽造者でも、その人が生命体のずっと大きいサンプルから得たDNAに対する診断用DNAプロープの完全な一組をもっていない限り、いかなる方法によってもこのことを語り始めることさえできないのであるから、この技術の適用を形成するのにどの1000個のDNAを選択したかを偽造者が知ってしまうという「最悪のケース」の例でも起こらない限り、偽造者がこのパターンを再生できる確率を計算する直捷の道はない。この場合ドット18個の完全なタグについて偽造者が正確な列を再生する確率は 10^{54} に1である。明らかに、いかなる信頼性限界も、タグのマーカーに利用できるシグナルDNAの数およびタグに適用するシグナルDNAの数に応じて選択することができる。

これらの特徴は、本発明を適用し得るさらに進んだレベルにもあてはまる。これは、DNA制限酵素の多型性に基づく生体の同一性における微小な差の検出に依存する。これをいかに行なうかは我々のW0-A-86/02101に開示されている。これによって、いずれかの同一性（種類）は知られている第一と第二の生体が同一であるかどうかを決定するための方法が得られる。この方法は、

(1) 第一の生体のゲノムDNAを1種以上の制限エンドヌクレアーゼで消化し、

(ii) こうして得られたDNA断片を電気泳動によって分離し、
(iii) こうして分離した断片の、1種以上の第一の制限プローブとハイブリダイズする断片の位置を決定し(「ハイブリダイゼーションパターン」、「バンドパターン」または「マップ」)
【このプローブまたは各々のプローブは第一または第二の生体と同じ種の生体のゲノムDNAからランダムに調得されたDNA断片を含む】、

(iv) こうして決定された断片の位置を、前記第一のプローブまたはその各々に結合するDNA断片(これは第一の生体のゲノムDNAから得られたDNA断片と同じ方法によって第二の生体のゲノムDNAを前記の制限エンドヌクレアーゼまたはその各々で消化して第二の生体のゲノムDNAから生成しかつ電気泳動にかけておいたものである)の位置と比較することからなり、

ここで、ステップ(i)から(iv)は、ステップ(iv)での比較によってふたつの生体が同一でありそうであることが明らかにされた場合、このふたつの生体が真に異なる無関係のものとして区別され得ないという確率(X)、すなわち

$$X = F^q \quad (1)$$

【ただし、qはステップ(iii)におけるプローブ検査によって

1つ以上の別の部分についてステップ(a)から(d)を繰返す(ただし、毎回異なる前記のDNA断片からなる前記第二の制限プローブを用いる)

ことによって実施する。

換言すると、qは、2つの生体が同一のマップをもっている場合、ステップ(iv)における第一と第二の生体の対合比較によって明らかにされたDNA消化断片の共通の位置の合計数である。

ステップ(i)から(iv)は、

(i') 第一の生体のゲノムDNAと第二の生体のゲノムDNAとを同じ制限エンドヌクレアーゼによって別々に消化し、場合によっては各消化物をいくつかの部分に分割し、

(ii') 各生体について消化物または消化物の一部を平行してゲル電気泳動にかけ、

(iii') 前記第一の制限されたプローブを用いてゲルをプローブ検査し、こうして異視された2つの生体のハイブリダイゼーションパターンを比較し、

(iv') 場合によっては、各生体の消化物の1個以上の別の部分について、ただし毎回異なる前記のDNA断片からなる前記第一の制限されたプローブを用いてステップ(ii')と(iii')を

明らかにされた位置の底であり、Fは、第一と第二の生体と同じ種から独立に得られた生体の対のゲノムDNAを制限エンドヌクレアーゼ消化したものの面における、同一であるDNA断片の割合を表わす率である】によって決定される確率(X)が 10^{-12} 以下となるように、ステップ(iii)におけるハイブリダイゼーションによって充分なバンドが異視されるような量のプローブDNAと1種以上の制限エンドヌクレアーゼを使用し、
(a) 前記第一と第二の生体と同じ種を代表するF値を得るのに充分な数の、前記種から独立に得た生体のゲノムDNAを、同じ制限エンドヌクレアーゼを使用して別々に消化し、場合によっては各々の消化物を別々の部分に分割し、
(b) 独立に得た生体の各々に対して消化物または消化物の一部を、平行してゲル電気泳動にかけ、
(c) 前記種の生体のゲノムDNAからランダムに得られたDNA断片からなる第二の制限プローブを用いてゲルをプローブ検査し、
(d) こうして異視化されたゲル上のハイブリダイゼーションパターンを、独立に得た生体の対合結合(pairwise combinations)に関して比較し、さらに
(e) 場合によっては、独立に得た生体の各々に対する消化物の

繰返す

ことによって実施するのが好ましい。

ステップ(i')から(iv')の手順は、各回毎に異なる制限エンドヌクレアーゼを用いて二回以上実施することができる。

W0-A-86/02101の方法は、2つの生体に対するハイブリダイゼーションパターンの面にある差を検出できないことがどの程度同一性の証明と考えられるかの程度に依存する。その方法を本発明に適用して、シグナルDNA(第一の生体)は、典型的な場合25~250時の量でタグに適用(塗布)する。このタグを、真偽を立証したい品物または物質に付着(結合)させる。物品の真偽を決定するには、たとえば電気泳動によってシグナルDNAをタグから除去し、すでに貯蔵しておいた本物のシグナルDNA(第二の生体)と比較する。シグナルDNAのシグナル配列は、W0-A-86/02101に従ってハイブリダイゼーションパターンを決定する際に使用するプローブとハイブリダイズする配列である。シグナル配列はあらかじめ決定し得る。プローブは先に調製して貯蔵しておくことができる。あるいはまたプローブは、ラベルから選定されるシグナルDNAを本物のシグナルDNAと比較する時点で製造することもできる。

W0-A-86/02101の方法を利用することによって、あるシグナ

ルDNAが所与の種の特定の株に由来するものであることを所定の検査程度まで解析することができる。このように、追加される各DNAについてそれが特定の株に由来するという信頼関係を確立することができる。たとえば、 3×10^{12} に1回の信頼度で誤って同一であるとされるような場合、両のタグの製造者が2つの正確なシグナルDNAを用いてタグを作成するチャンスは 9×10^{124} である。

また別の場合にはシグナル化合物がタクバク質であってもよい。ここで本発明はいろいろなタンパク質のアミノ酸配列の変化とそのような配列を認識する能力とによっている。たとえば抗原-抗体システムを使用してもよい。シグナル化合物が抗原として機能する場合、シグナル配列は抗体によって認識される抗原決定基である。シグナル化合物が抗体として機能する場合、シグナル配列はこの抗体の中で対応する抗原に結合する際に媒介となる配列である。抗原分子と抗体分子の双方がイムノグロブリンであるイディオタイプ-抗-イディオタイプシステムを使用してもよい。一方のイムノグロブリンが他方の抗原結合部位に対する結合特異性を有している。

抗体-抗原システムは以下のようにして用いることができる。一連の異なるハプテンのような、交差反応しない各標の異なる

抗原で動物群を免疫して抗体を製造する。その動物から血清を収縮し、個々の抗原に対して生じた抗体を精製する。次にこの抗体を、硝酸セルロースまたはナイロンベースの基材たとえばHybond OやHybond Nのような適切な基材上に固定化する。抗体を付けたパターン化された一連のポイントを望みどおりに作り上げる。次いでこの結合用の膜の非特異的結合特性をブロックする。この膜を乾燥し、プラスチックの下に密封し、真偽を立証したい品物または物質につなぐ。解決するには、特異的な抗原またはハプテンをタグに塗布する。適当な検出系を用いて結合を検出する。

本発明によって提供される安全性は、シグナル化合物が秘密に保たれる特定の暗号系に依存する。あらかじめ決定した所定のシグナル化合物を標的に使用するが、その同一性（種類）は公表しない。どのシグナル化合物が使用されているかが肉眼の検査では明らかにならないようにして品物と物質を標識する。しかし、製造業者は、品物が容易に同定されるように自分の製品を安全に標識したいならば、それが本発明に従って標識されていることを公表するかあるいはこの事実を暗示しないで目的を達成することができる。

前者の場合、製造業者は広告によって、本物の製品がすべて

シグナル化合物で、たとえばタグの形態で保護されていることを宣言することができる。このタグは、取外しのできる自立つづべを形成していてもよい。ただしこのラベル上には、なんらかの所定の印刷した情報、とくに製造業者の個々の独特のタグに対するバーコード番号が出現するようになっている。製品を購入した消費者はこのタグを調査分析させるために郵送することができる。したがって偽って印刷されたタグは容易に同定することができる。

後者の場合製造業者はタグの存在を公表することなく秘密裡にそのタグを自分の製品に付ければよい。製造業者の代理人が通常の消費者を誘って小売店から製品をサンプリングすることによって、このタグの製造者は偽物の製品が出現しているか否かを発見することが可能になる。

どちらの道を採用したとしても各々のタグはユニークであり得、かついろいろなシグナル化合物を有し得る。あるいは、同じシグナル化合物をもった一群のタグを使用してもよい。シグナルDNAを使用する場合、すでに記載したどちらのレベルでも作動するようにタグを設計することができる。

以下の実施例で本発明を例示する。

実施例 1: *Lactobacillus plantarum* 37L81(NCIB 12156) の DNA に対するプラス/マイナス試験

Lactobacillus plantarum 37L81 は WO-A-48/02101 に記載されている。これは、1985年 9月25日、the National Collection of Industrial (現在 is and Marine) Bacteria, Aberdeen, (英国) に受託番号 NCIB 12156 として寄託されている。WO-A-48/02101 に記載されているようにして 37L81 からゲノム DNA を得た。このゲノム DNA を 100° で 5 分間加熱して変性した。

Hybond C または K のタグの材料上に DNA を付着させるためにこのタグの反対側から変性 DNA の溶液の試料を塗布した。タグは次いで 37°C で 30 分間乾燥した。次に、 80°C で 4 時間までベーキングすることにより、またはタグを 30 分間紫外光 (304nm) に露出することにより、変性 DNA をタグに共有結合させた。いくつかのタグは、可溶性で透明な PVC (ICI plc) かサランラップ (Dow Corning) で覆うことにより保護した。また、綿織物とナイロン織物 (シャツ) も変性 DNA で標識した。各織物に変性 DNA の溶液を 100 倍ずつ加えた後真空中で乾燥した。5ng から 5 μg の量の DNA をタグと織物に塗布した。

その後、プラスチックフィルムが付いていたタグからそのフィルムを除去した。5 μm 厚のポリエチレンテレフタレート (PET) のフィルムを除去した。5 μm 厚のポリエチレンテレフタレート (PET) の

液でこのタグを染色した。紫外線を照射(304nm)すると赤褐色のケイ光が観察された。これは、エチジウムブロマイドがDNAに結合したことを意味している。類似のやり方でシャツの綿織物とナイロン織物のDNAが塗布されている領域をエチジウムブロマイド溶液で染色した。やはりケイ光が観察され、DNAの存在が明らかになった。

実施例 2: 固有で単一または低いコピー数のシグナル配列を用いたタグの製造

1. シグナルDNAおよびプローブDNAの調製

- 1.1. 微生物のDNA源を選択する。
- 1.2. 標準的な手法によってゲノムDNAを調製・精製して純粋な高分子量のDNAを得る。
- 1.3. DNAを制限酵素(たとえばS_{au}3A)で消化してプローブ用の特異的配列を選択し、1%アガロースゲル電気泳動によりDNAをサイズ分離し、これから、便利なサイズの断片を電気転写し[McDonnell H.W. ら(1977) J. Molec. Biol., 110, 119参照]、消したプラスミドベクター中へクローン化することができる。これらのクローンは次に、Kafatos C.ら(1979) Nucleic Acids Research, 7, 1541の最速な「ドットプロット」法のようなテストを用いて他のDNA源との相関性を

2.2. この膜を乾燥し、密封する。

3. タグの原稿

3.1. 問題にしている物品に対して調製したタグの本質的な特徴を記録するデータバンクを参照する。タグの上に印刷されている数を使用して、どんなDNAが使用されたか、およびシグナルドットマトリックス上にどのようにDNAを分布させたかを検証することができる。適当なプローブの混合物またはひとつのプローブを一時に使用して、本物のDNAが塗布されているであろう回収されたタグ上の部位に対するこれらのプローブの特異的ハイブリダイゼーションによってタグの真偽を証明する。

実施例 3: 複製DNAおよび多コピーDNAを用いたタグの製造

1. 複製DNAの製造

- 1.1. 微生物のDNA源を選択する。
- 1.2. 生体を成長させてDNAを得る。
- 1.3. DNAを抽出し、標準的な手法によって精製して高分子量のDNAを得る。
- 1.4. DNAを任意放逐して、選択したシグナルDNAの分子数に等しい平均分子量を有する分子の1団を得る。

試験することができる。この方法に従うと、所望のDNA源と特異的にハイブリダイズする配列を選択することが可能になる。別法として、このようなプローブはLasser E.E.およびPalmer E. (1984) Cell, 37, 171-177の欠失富化技術のような富化技術を用いて同定することができ、こうすると労力が大幅に軽減される。

1.4. 適切なプローブを選択した後、標準的なプラスミド調製技術を用いてシグナルDNAを大量に調製し、抽出・精製して高分子量のDNAを得る。

1.5. シグナルDNAはいずれも、所望であればButler E.T. & Chamberlain H.H. (1982) J. Biol. Chem., 257, 5772が記載しているSP系列のベクターを使用することにより、一本鎖のRNA誘導体に変換することができる。この誘導体は一本鎖のDNAよりも迅速にDNAとハイブリダイズし、しかも制限酵素で切断することができない。

2. タグの製造

2.1. タグマトリックス上のドットの各々に対して、タグ膜上の選択された部位にそれぞれ選択した配列のシグナルDNA 5~10μ(または任意の充分量)を塗布する。DNAを酸性し、これを膜たとえばHybond DまたはHybond Nに共有結合させる。

1.5. 膜を乾燥し、密封する。

2. シグナルDNAの調製

2.1. 微生物のDNA源を選択する。これらは複製DNAの配列と同じであっても同じでなくてもよい。

2.2. 標準的な手法によってゲノムDNAを調製・精製して純粋な高分子量のDNAを得る。

2.3. DNAを制限酵素(たとえばS_{au}3A)で消化してプローブ用の特異的配列を選択し、1%アガロースゲル電気泳動によりDNAをサイズ分離し、これから、便利なサイズの断片を電気転写し[McDonnell H.W. ら(1977) J. Molec. Biol., 110, 119参照]、消したプラスミドベクター中へクローン化することができる。これらのクローンは次に、Kafatos C.ら(1979) Nucleic Acids Research, 7, 1541の最速な「ドットプロット」法のようなテストを用いて他のDNA源との相関性を試験することができる。この方法に従うと、所望のDNA源と特異的にハイブリダイズする配列を選択することが可能になる。別法として、このようなプローブはLasser E.E.およびPalmer E. (1984) Cell, 37, 171-177の欠失富化技術のような富化技術を用いて同定することができ、こうすると労力が大幅に軽減される。

2.4. 適切なプローブを選択した後、標準的なプラスミド調製技術を用いてシグナルDNAを大量に調製する。同様の遠隔DNAかまたは同様の遠隔DNAに添加するのにシグナルDNAが必要の場合、このシグナルDNAはさらに精製しなければならない。すなわち、適当な制限酵素を用いて特異的シグナル配列を切除した後、標準的な手法により残留するプローブDNAからシグナルDNAを分離する。このような精製シグナルDNAはその後同様な平均分子量の純化された遠隔DNAに添加できる。

2.5. シグナルDNAはいずれも、所望であればButler E.T. & Chamberlain H.W. (1982) J. Biol. Chem., 257, 5772に記載しているSP系列のベクターを使用することにより、一本鎖のRNA誘導体に変換することができる。この誘導体は一本鎖のDNAよりも迅速にDNAとハイブリダイズし、しかも制限酵素で切断することができない。

3. タグの製造

3.1. シグナルDNAを遠隔DNAと混合して、遠隔DNAの各単位に対して40~100 コピーの個々のシグナルDNA単位を有する。タグマトリックス上のドットの各々に対して、タグ膜上の選択された部位にDNAの混合物50~10000(または任意

の充分量)を塗布する。DNAを変性し、これを膜たとえばHybond BまたはHybond Nに共有結合させる。

3.2. この膜を乾燥し、密封する。

4. タグの解読

4.1. 問題にしている物品に対して調製したタグの本質的な特徴を記録するデータベースを参照する。タグの上に印刷されている数を使用して、どんなDNAが使用されたか、およびシグナルドットマトリックス上にどのようにDNAを分布させたかを推定することができる。その後適当なプローブの混合物またはひとつのプローブを一時に使用して、本物のDNAが塗布されているであろう回収されたタグ上の部位に対するこれらのプローブの特異的ハイブリダイゼーションによってタグの真偽を証明する。

実施例 4: 固有でコピー数の多い同一のシグナル配列を用いたタグの製造

Lactobacillus plantarum BT151のゲノムDNAから4種のプローブを製造した。これらのプローブはpBT18、pBT123、pBT129およびpBT130であった。これらのプローブの製造はW0-A-86/02101に記載されている。そこに記載されているようにしてこれらのプローブを複製した。これらのプローブを、迅速な

「ドットプロット」法により他の起源のDNAとの相同性について試験した。特にW0-A-86/02101に記載されているようにして使用した高厳密条件下で試験した膜または膜のいずれに由来するDNAとも有意にハイブリダイズしたものはなかった。これら試験した他のDNAが*Lactobacillus plantarum*に由来しないDNAとハイブリダイズすることを疑う理由はない。したがって、これらの4種のプローブは所与の種に独特のものであり、これら4種はいずれも*L. plantarum* DNAを抽出するのに使用することができるであろう。さらに解析したところ、実際にはプローブpBT129だけが*L. plantarum*のDNAと顕著にハイブリダイズすることが示された。

L. plantarum BT151のゲノムDNAを、実施例1に記載されているようにしてHybond CのタグまたはHybond Nのタグに共有結合した。実施例1に記載されているプラスチックフィルムで密封したタグを実施例1に記載されているようにして製造した。その後タグを密封しているプラスチックフィルムを除いて各タグの分析ができるようにした。

これらのプローブを使用して*L. plantarum*のシグナルDNAの存在を検出するために、これらのプローブを、 $[^{35}\text{S}]$ -dCTP (デオキシシチジン5'- α $[^{35}\text{S}]$ -チオトリホスフェ

ート)またはRenzでラベルしたプローブ(Nucleic Acid Research, 12, 3435-3444, 1964)、すなわち酵素の西洋ワサビペルオキシダーゼに結合したプローブのどちらかで複製した。

ヒートシールしたポリエチレンバッグ(Pitco Ltd.)中、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の変性したニシン精子DNA(Sigma Chemical Co.)を含有するプレハイブリダイゼーションバッファー[6X SSC; 5X Benhardt's 溶液-0.1% (W/V)-Picol-400, 0.1% (W/V)ウシ血清アルブミン、0.1% (W/V) SDS]中でタグを3時間洗浄した。新しいプレハイブリダイゼーションバッファー中65℃でハイブリダイゼーションを実施し、複製されたDNAプローブを変性した後に最終温度10~20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えた。ハイブリダイゼーション反応液を含有するシールしたポリエチレンバッグを65℃で18時間インキュベートした。ハイブリダイゼーションの後、フィルターを65℃の2X SSC中で15分ずつ二回、65℃の2X SSC, 0.1% (W/V) SDS中で30分かけて一回、最後に65℃の0.1X SSCまたは1X SSCである最終洗浄液中で10分間洗浄した。次に、Whatman 3MM クロマトグラフィーペーパーを用いてフィルターをプロット乾燥した。

W0-A-86/02101に記載されているようにしてオートラジオグラフィック、または比色酵素反応(Renzら)によって、同様の

シグナルDNAの存在を検出した。検出の方法では、タグ上の同種シグナルDNAの位置はX線フィルム上に暗いスポットとして現れた。同種でないDNAの結合がない場合にはスポットは検出されなかった。同様に、RozZの技術では、L. plantarumのシグナルDNAおよびプローブDNAのハイブリダイゼーションが存在すると、酵素反応の黒い生成物が析出した。

実施例 5：より安全性の高いタグの製造

1. タグの製造

1.1. WO-A-86/02101 に記載の手順に従ってすでに特異的に固定されているDNAを有するいくつかの微生物から、高分子量の二本鎖DNAを調製する。

1.2. 250μlまでの選択したDNAを、タグ膜上の広さが約250μlの定められた部位に塗布し、この膜からその後続的な(intact)DNAを溶出した。

2. タグの読解 (decoding)

2.1. 関係にしている物品に対して調製したタグの本質的な特徴を記録するデータベースを会照する。印刷されている数を使用して、どんなシグナルDNAが使用されたかを検証することができる。本物のDNAが塗布されているであろう同取され

たタグ上の部位の電気印出を実施した後、WO-A-86/02101の方法に従って解析することによって解析を進める。

国際調査報告

International Application No. PCT/GB 87/00242

<p>1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (Inventor's classification only, optional only)</p> <p>IPC⁴: G 09 F 3/00; // C 12 Q 1/68</p>																									
<p>2. PUBLIC DISCLOSURE</p> <p>Publication System: <input type="checkbox"/> Abstract System: <input type="checkbox"/></p> <p>IPC⁴: G 09 F</p>																									
<p>3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT⁵</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category⁶</th> <th>Document or Reference⁷, with indication, where appropriate, of the relevant passages of</th> <th>Relevant to Claim No. 1⁸</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>US, A, 3861886 (MELLOY) 21 January 1975 see column 3, lines 16-55; column 7, lines 5-36; column 10, lines 5-35; column 11, lines 39-50</td> <td>1,2,4-6, 17-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>---</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>EP, A, 0133671 (MILES LABS. INC.) 6 March 1985 see pages 4-25</td> <td>1,2,4-6, 17-19</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>---</td> <td>7-15, 20-21</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 4390452 (MINNESOTA MINING & MANUFACTURING CO.) 28 June 1983 see the whole document</td> <td>1-4, 16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP, A, 0111340 (INTEGRATED GENETICS, INC.) 20 June 1984 see the whole document</td> <td>1,2,4-15, 17-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 3755178 (ERIKSSON) 15 May 1973 see column 1, lines 50-68; column 2, //</td> <td>1-4, 16-19</td> </tr> </tbody> </table>		Category ⁶	Document or Reference ⁷ , with indication, where appropriate, of the relevant passages of	Relevant to Claim No. 1 ⁸	Y	US, A, 3861886 (MELLOY) 21 January 1975 see column 3, lines 16-55; column 7, lines 5-36; column 10, lines 5-35; column 11, lines 39-50	1,2,4-6, 17-19	A	---	16	Y	EP, A, 0133671 (MILES LABS. INC.) 6 March 1985 see pages 4-25	1,2,4-6, 17-19	A	---	7-15, 20-21	A	US, A, 4390452 (MINNESOTA MINING & MANUFACTURING CO.) 28 June 1983 see the whole document	1-4, 16	A	EP, A, 0111340 (INTEGRATED GENETICS, INC.) 20 June 1984 see the whole document	1,2,4-15, 17-22	A	US, A, 3755178 (ERIKSSON) 15 May 1973 see column 1, lines 50-68; column 2, //	1-4, 16-19
Category ⁶	Document or Reference ⁷ , with indication, where appropriate, of the relevant passages of	Relevant to Claim No. 1 ⁸																							
Y	US, A, 3861886 (MELLOY) 21 January 1975 see column 3, lines 16-55; column 7, lines 5-36; column 10, lines 5-35; column 11, lines 39-50	1,2,4-6, 17-19																							
A	---	16																							
Y	EP, A, 0133671 (MILES LABS. INC.) 6 March 1985 see pages 4-25	1,2,4-6, 17-19																							
A	---	7-15, 20-21																							
A	US, A, 4390452 (MINNESOTA MINING & MANUFACTURING CO.) 28 June 1983 see the whole document	1-4, 16																							
A	EP, A, 0111340 (INTEGRATED GENETICS, INC.) 20 June 1984 see the whole document	1,2,4-15, 17-22																							
A	US, A, 3755178 (ERIKSSON) 15 May 1973 see column 1, lines 50-68; column 2, //	1-4, 16-19																							
<p>4. BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION</p> <p>The invention relates to a method for the identification of a sample of DNA or RNA by means of a tag which is fixed to a support. The tag is a short DNA or RNA sequence which is complementary to a specific sequence of the sample. The tag is fixed to the support by means of a chemical reaction. The sample is then hybridized to the tag. The hybridization is detected by means of a fluorescent label or a radioactive label. The method is particularly suitable for the identification of DNA or RNA samples which are present in a mixture.</p>																									
<p>5. BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS</p> <p>The drawings show a schematic representation of the method of the invention. Figure 1 shows a tag fixed to a support. Figure 2 shows a sample hybridized to the tag. Figure 3 shows the detection of the hybridization.</p>																									
<p>6. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION</p> <p>The invention relates to a method for the identification of a sample of DNA or RNA by means of a tag which is fixed to a support. The tag is a short DNA or RNA sequence which is complementary to a specific sequence of the sample. The tag is fixed to the support by means of a chemical reaction. The sample is then hybridized to the tag. The hybridization is detected by means of a fluorescent label or a radioactive label. The method is particularly suitable for the identification of DNA or RNA samples which are present in a mixture.</p>																									
<p>7. CLAIMS</p> <p>1. A method for the identification of a sample of DNA or RNA by means of a tag which is fixed to a support, the method comprising the steps of: (a) fixing a tag to a support, the tag being a short DNA or RNA sequence which is complementary to a specific sequence of the sample; (b) hybridizing the sample to the tag; and (c) detecting the hybridization.</p>																									
<p>8. REFERENCE TO THE DRAWINGS</p> <p>Fig. 1: Schematic representation of a tag fixed to a support.</p> <p>Fig. 2: Schematic representation of a sample hybridized to the tag.</p> <p>Fig. 3: Schematic representation of the detection of the hybridization.</p>																									
<p>9. SIGNATURE</p> <p>Date of the International Filing: 18th June 1987</p> <p>Date of the International Search Report: 28 JUL 1987</p> <p>Applicant: EUROPEAN PATENT OFFICE</p> <p>Inventor: M. VAN MOL</p>																									

Form PCT/ISA 210 (second sheet) January 1983

International Application No. PCT/GB 87/00242

<p>10. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUATION FROM THE SECOND SHEET)</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category⁶</th> <th>Document or Reference⁷, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to Claim No. 1⁸</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td></td> <td>lines 57-65; columns 4-6</td> <td></td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 3772200 (MINNESOTA MINING & MANUFACTURING CO.) 13 November 1973 see abstract; column 6, lines 5-20</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 4387112 (BLACH) 7 June 1983 see abstract</td> <td>1,2,4,16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US, A, 4383963 (SCHERMAN et al.) 14 December 1982 see abstract</td> <td>1,2,4,16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Nucleic Acids Research, volume 13, no. 3, February 1985, IRL Press Limited, (Oxford, GB); A.C. Forster et al.: "Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin", see pages 745-761</td> <td></td> </tr> <tr> <td>P.A.</td> <td>WO, A, 86/02101 (BIOTECNICAL LTD) 19 April 1986 cited in the application</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>		Category ⁶	Document or Reference ⁷ , with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No. 1 ⁸		lines 57-65; columns 4-6		A	US, A, 3772200 (MINNESOTA MINING & MANUFACTURING CO.) 13 November 1973 see abstract; column 6, lines 5-20	16	A	US, A, 4387112 (BLACH) 7 June 1983 see abstract	1,2,4,16	A	US, A, 4383963 (SCHERMAN et al.) 14 December 1982 see abstract	1,2,4,16	A	Nucleic Acids Research, volume 13, no. 3, February 1985, IRL Press Limited, (Oxford, GB); A.C. Forster et al.: "Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin", see pages 745-761		P.A.	WO, A, 86/02101 (BIOTECNICAL LTD) 19 April 1986 cited in the application	
Category ⁶	Document or Reference ⁷ , with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No. 1 ⁸																				
	lines 57-65; columns 4-6																					
A	US, A, 3772200 (MINNESOTA MINING & MANUFACTURING CO.) 13 November 1973 see abstract; column 6, lines 5-20	16																				
A	US, A, 4387112 (BLACH) 7 June 1983 see abstract	1,2,4,16																				
A	US, A, 4383963 (SCHERMAN et al.) 14 December 1982 see abstract	1,2,4,16																				
A	Nucleic Acids Research, volume 13, no. 3, February 1985, IRL Press Limited, (Oxford, GB); A.C. Forster et al.: "Non-radioactive hybridization probes prepared by the chemical labelling of DNA and RNA with a novel reagent, photobiotin", see pages 745-761																					
P.A.	WO, A, 86/02101 (BIOTECNICAL LTD) 19 April 1986 cited in the application																					

Form PCT/ISA 210 (first sheet) January 1983

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON

INTERNATIONAL APPLICATION NO. PCT/US 87/00242 (SA 18773)

This Annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 08/07/87.

The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A- 3841886	21/01/75	None	
EP-A- 0113671	06/03/83	AU-A- 3138784 JP-A- 60100058	07/02/85 03/05/85
US-A- 4390482	28/06/83	None	
EP-A- 0111340	20/08/84	JP-A- 59122499 US-A- 4588882 CA-A- 1211058	14/07/84 13/03/85 09/09/86
US-A- 3733178	18/05/73	None	
US-A- 3771200	13/11/73	US-A- 3897284	29/07/75
US-A- 4387112	07/06/83	None	
US-A- 4383965	14/12/81	None	
WO-A- 8603101	10/04/86	JP-T- 62800423 EP-A- 0227678	25/02/87 08/07/87

For more details about this annex :
see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/81

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.